



Государственный комитет
СССР
по делам изобретений
и открытий

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

659573

THE BRITISH LIBRARY

7 SEP 1979

SCIENCE REFERENCE LIBRAR

(51) М. Кл.²

С 07 Н 21/02
А 61 К 29/00

(53) УДК 547.963.3.
.541.69 (088.8)

(61) Дополнительное к авт. свид-ву -

(22) Заявлено 31.05.77 (21) 2491239/23-04

с присоединением заявки № -

(23) Приоритет -

Опубликовано 30.04.79. Бюллетень № 16

Дата опубликования описания 30.04.79

(72) Авторы
изобретения

С.М. Женодарова, В.А. Поротикова, В.П. Клягина и Р.И. Жданов

(71) Заявители

Институт биологической физики АН СССР
и Научно-исследовательский институт по биологическим
испытаниям химических соединений

(54) СПИН-МЕЧЕНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ОЛИГОРИБОНИКЛЕОТИДОВ
КАК СПИНОВЫЕ ЗОНДЫ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ
ФЕРМЕНТОВ И СПОСОБ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ

1

Данное изобретение относится к новому способу получения новых спин-меченных производных олигорибонуклеотидов общей формулы N_pN , N_pN'' и $N_pN''N'''$ где N_p и N - нуклеотиды и нуклеозиды пиримидинового и пуринового ряда, N_p и N'' - производные аденоэин-3'-фосфата или цитидин-3'-фосфата и соответственно цитидина, содержащие спиновую метку в виде остатка 1-оксил-2,2',5',5'-тетраметил-3'-карбонилпирролина в качестве заместителя по амино-группе аденина или цитозина, являющихся спиновыми зондами для исследования механизма действия ферментов, катализирующих различные превращения рибонуклеиновых кислот, и определения их содержания в организме.

Известны спин-меченные монорибонуклеотиды, которые применяются в качестве спиновых зондов для изучения Na , K -аденозинтрифосфатазы [1]. Известные спин-меченные рибонуклеотиды являются либо моно-, либо полиривнуклеотидами и являются спиновыми зондами для определенных ферментов.

Цель изобретения - синтез новых спин-меченных производных олигорибонуклеотидов, расширяющих арсенал

средств исследования механизма действия ферментов.

Известен способ получения спин-меченных монорибонуклеотидов, в частности спин-меченных аденоэинтрифосфатов, по 2' (3')-гидроксильной группе действием имидазолида кислоты-радикала на водные растворы нуклеотидов [2]. Однако этим методом трудно получить спин-меченные олигорибонуклеотиды из-за неустойчивости имидазолида кислоты-радикала.

Поставленная цель достигается путем использования в качестве спин-меченных производных нуклеозид-2', 3'-циклофосфатов и проведения реакции при участии соответствующих ферментов.

Настоящий способ получения спин-меченных производных олигорибонуклеотидов заключается в том, что спин-меченные нуклеозид-2', 3'-циклофосфаты или нуклеозиды пиримидинового и пуринового ряда подвергают взаимодействию соответственно с нуклеозидами или нуклеотидами при температуре 0-4°C в присутствии специфических рибонуклеаз в соответствующем буферном растворе с последующим взаимодействием при температуре 36-37°

20

25

30

полученных спин-меченых динуклеозид-монофосфатов с нуклеозид-5-дифосфатами при участии полинуклеотидфосфорилазы в трис-буфере при pH 9,0-9,2.

Получение исходных веществ.

Пример 1. N⁶-(1-оксил-2,2,5,5-тетраметил-3-карбонилпирролин)-аденозин-2'-(3')-фосфат.

К суспензии 0,2 г (0,47 М) Ру-соли аденоzin-2'-(3')-фосфата в 3 мл абсолютного пиридина добавляют хлорангидрид, полученный из 1,1 г 2,2,5,5-тетраметил-3-карбоксипирролин-1-оксила, в 2,5 мл абсолютного пиридина при охлаждении в бане из сухого льда и ацетона. Образовавшийся раствор оставляют при комнатной температуре на 3,5 ч. Выпавший осадок отфильтровывают и промывают абсолютным пиридином. К охлажденному фильтрату добавляют 3,5 мл дистиллированной воды и раствор экстрагируют три раза хлороформом (20, 10, 5 мл). Хлороформный слой сушат безводным Na₂SO₄ и упаривают досуха при комнатной температуре. К осадку добавляют 8 мл 50%-ного водного пиридина, раствор охлаждают, приливают 7 мл предварительно охлажденного 2 н. NaOH и оставляют при комнатной температуре на 15 мин. Затем быстро добавляют Даузкс 50x4 (100-200 меш) в Ру-форме до pH 7,5. Смолу отфильтровывают и промывают тремя объемами 2 М водного пиридина. Фильтрат и каждую из промывок пропускают через колонку с 40 мл свежего Даузкс 50x4 (100-200 меш) в Ру-форме. Объединенные промывки упаривают при добавлении пиридина до выпадения осадка кислоты. Из этой смеси (pH 6-7) кислоту-радикал экстрагируют эфиrom (~100 мл). Водный раствор упаривают на роторе при комнатной температуре досуха. Получают 0,19 г спин-меченого производного, загрязненного исходным нуклеотидом. Далее очистку проводят методом препаративной БХ в системе (А). Выход 60%; R_f 0,61 (А); U_{отн} 0,86; УФ-спектр: λ_{макс} 282 нм.

Пример 2. N⁴-(1-оксил-2,2,5,5-тетраметил-3-карбонилпирролин)-цитидин-2'-(3')-фосфат получают аналогично описанному в примере 1. Время гидролиза перацильного производного 30 мин. Выход 70%; R_f 0,69 (А); U_{отн} 0,87; УФ-спектр: λ_{макс} 260, 303 нм.

Пример 3. N⁴-(1-оксил-2,2,5,5-тетраметил-3-карбонилпирролин)-цитидин получают аналогично описанному в примере 1. Очистку проводят методом препаративной ТСХ на пластинах из силуфола в системе n-бутанол, насыщенный водой. С адсорбента спин-меченный цитидин элюируют этанолом. Выход 60%; R_f 0,84 (Б); U_{отн} 1,12. Т.пл. 132-134°. УФ-спектр: λ_{макс} 260, 303 нм. Спектр ЭПР (хлоро-

форм): α_N 15,6; содержание спинов: 5,8 · 10²³ спин/моль. Для C₁₈H₂₅N₄O₇ вычислено, %: C 52,80; H 6,16; N 13,68. Найдено, %: C 53,19; 52,97; H 6,45; 6,35; N 13,93; 13,81.

Пример 4. N⁴-(1-оксил-2,2,5,5-тетраметил-3-карбонилпирролин)-цитидин-2',3'-циклофосфат. 153 о.е. (8 мкМ) спин-меченный цитидин-2 (3')-фосфата растворяют в 1 мл воды, доводят pH раствора 0,1 н. НС₂ до 6,0 и добавляют 25 мг п-толуолсульфоната циклогексил-β-[N-(N-метилморфолиния)]-этилкарбодиамида. Реакционную смесь оставляют на 4 ч при комнатной температуре, поддерживая pH равным примерно 6,0. Затем реакционную смесь упаривают досуха на роторе. Остаток промывают несколько раз эфиrom, после чего растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды и делят методом препаративного электрофореза на бумаге. После обессоливания в системе этанол:вода-7:3 получают 85 о.е. (56%) хроматографически чистого циклофосфата. R_f 0,91 (А); U_{отн} 0,62; УФ-спектр: λ_{макс} 260, 303 нм.

Пример 5. N⁶-(1-оксил-2,2,5,5-тетраметил-3-карбонилпирролин)-аденозин-2',3'-циклофосфат получают аналогично описанному в примере 4. Выход 52%; R_f 0,85 (А); U_{отн} 0,64; УФ-спектр: λ_{макс} 282 нм.

Получение целевого продукта.

Пример 6. N⁴-(1-оксил-2,2,5,5-тетраметил-3-карбонилпирролин)-цитидил-(3'→5')-цитидин. 136 о.е. (8 мкМ) спин-меченного цитидин-2',3'-циклофосфата и 80 мкМ цитидина в 0,16 мл 0,05 М трис-НС₂-буфера (pH 7,6), содержащего панкреатическую рибонуклеазу в концентрации 0,16 мг/мл, инкубируют при 0-4°C около двух недель. Спин-меченный цитидил-(3'→5')-цитидин выделяют методом препаративного электрофореза на бумаге. Дополнительную очистку проводят, хроматографируя в системе (Б). Получают 23 о.е. (30%). R_f 0,84 (А); U_{отн} 1,58; УФ-спектр: λ_{макс} 262, 303 нм.

Пример 7. Гуанилил-(3'→5')-N⁴-(1-оксил-2,2,5,5-тетраметил-3-карбонилпирролин)-цитидин. 60 мкМ гуанозин-2',3'-циклофосфата (гуанидиновая соль) и 180 мкМ спин-меченного цитидина в 6 мл 0,01 М фосфатного буфера (pH 7,0), содержащего рибонуклеазу Т в концентрации 50 ед.акт/мл, инкубируют в течение 5-6 ч при 0°C. Затем реакционную смесь делят методом препаративного электрофореза на бумаге. Полосы, содержащие спин-меченный гуанилил-(3'→5')-цитидин, пришивают к новым листам бумаги и хроматографируют в системе В. Получают 153 о.е. (~ 5 мкМ). Выход 20%; R_f 0,7 (Б); U_{отн} 1,5; УФ-спектр: λ_{макс} 259, 302 нм.

Приимеч. Гуаниил-(3'→5')-
 $-N^4$ -(1-оксил-2,2,5,5-тетраметил-3-
 карбонилпирролин, -цитидил-(3'→5')-
 -уридин. 145 о.е. (5 мкМ) GpC^{32P},
 2,5 мкМ уридин-5'-дифосфата (динат-
 риевая соль) и 3 мг ПНФ-азы М.
Iysodeiticus растворяют в 0,5 мл
 0,05 М три- $NaCl$ -буфера (рН 9,0-9,2),
 содержащего 0,01 М $MgCl_2$ и 0,05 ММ
 ЭДТА, и инкубируют при 36-37°C. Че-
 рез 2 ч всю реакционную смесь нано-
 сят на бумагу и хроматографируют в
 системе Б. Полосы, соответствующие
 различным компонентам реакционной
 смеси, элюируют водой и дополнитель-
 но очищают с помощью электрофореза
 и хроматографии в системе А. Полу-
 чают 10 о.е. (15%) GpCp^{32P}U(Rp(Up)
 1,55 (A); $U_{\text{отн}}$ 0,65; УФ-спектр: $\lambda_{\text{макс}}$
 259, 307 нм) и 5 о.е. GpCp^{32P}UpU
 (Rp(Up) 1,02 (A); $U_{\text{отн}}$ 0,68; УФ-спектр:
 $\lambda_{\text{макс}}$ 259, 307 нм).

Хроматографию и электрофорез прово-
 дят на бумаге марки ленинградская М
 и FN-3. При хроматографии ис-
 пользуют следующие системы раствори-
 телей: этанол - 1 М ацетат аммония
 (рН 7,5), 7:3 (A); этанол - концент-
 рированный аммиак - вода-65:10:25
 (B); изопропанол-концентрированный
 аммиак - вода-7:2:1 (B). Электрофо-
 рез на бумаге проводят в приборе
 для вертикального электрофореза фир-
 мы "Labor" (Венгрия) в течение 2 ч
 с градиентом напряжения 20 В/см в 0,05M
 триэтиламмонийбикарбонате, рН 7,5.

Формула изобретения

1. Спин-меченные производные олиго-
 рибонуклеотидов общей формулы N^{32P}N,

N^{32P}N' и N^{32P}N'', где N и N' - нукле-
 отиды и нуклеозиды пиримидинового и
 пуринового ряда; N^{32P} и N'' - производные
 аденоzin-3'-фосфата или цитидин-3-
 -фосфата и соответственно цитидина,
 содержащие спиновую метку в виде

5 остатка 1-оксил-2,2,5,5-тетраметил-
 -3-карбонилпирролина в качестве
 заместителя по амино-группе аденоина
 или цитозина, как спиновые зонды для
 исследования механизма действия фер-
 ментов.

10 2. Способ получения соединения
 по п.1, отличающийся тем,
 что спин-меченные нуклеозид-2',3'-цикло-
 фосфаты или нуклеозиды пиримидинового
 и пуринового ряда подвергают взаимо-
 действию соответственно с нуклеози-
 дами или нуклеотидами при температу-
 ре 0-4°C в присутствии специфических
 рибонуклеаз в соответствующем буфер-
 ном растворе с последующим взаимодей-
 ствием при температуре 36-37°C полу-
 ченных спин-меченных динуклеозидмоно-
 фосфатов с нуклеозид-5-дифосфатами
 при участии полинуклеотидфосфорилазы
 в три-буфере при рН 9,0-9,2.

Источники информации, принятые
 во внимание при экспертизе

1. Сухоруков Б.И., Петров А.И.
 Спин-меченные нуклеозиды, нуклеозид-
 -5-моно-, ди- и -трифосфаты. - "Био-
 физика", 1975, 20, с.965.

2. Табак М., Рууге Э.К., Смирно-
 ва И.Н., Петров А.И., Сухоруков Б.И.,
 Твердислов В.А. Взаимодействие мем-
 бранного препарата Na, K-АТФ-азы со
 спин-меченым аналогом АТФ. - "Био-
 химия", 1977, 42, № 3, с. 476.

Составитель Л.Никулина
 Редактор В.Минасбекова Техред И.Асталов Корректор Н.Стец

Заказ 2114/4

Тираж 512

Подписьное

ЦНИИПИ Государственного комитета СССР
 по делам изобретений и открытий

113035, Москва, А-35, Раушская наб., д.4/5

Филиал ППП "Патент", г.Ужгород, ул. Проектная, 4